

DIFFERENTIATION INDUCER

Patent number: JP2002078482
Publication date: 2002-03-19
Inventor: MIYAZAKI MASAHIRO; SHIMA NOBUYUKI; TOO KANJI
Applicant: SNOW BRAND MILK PROD CO LTD
Classification:
- **international:** C12N5/06; C07K14/475; C12N5/02
- **european:**
Application number: JP20000268156 20000905
Priority number(s): JP20000268156 20000905

Report a data error here

Abstract of JP2002078482

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a differentiation inducer comprising a hepatic cell proliferative factor as an active ingredient, capable of differentiating myeloid cells to hepatocytes and useful in the regenerative medicine involving artificial liver, hepatic cell transplantation and the like. **SOLUTION:** This differentiation inducer comprises as the active ingredient a hepatic cell proliferative factor such as TCF-11 or HGF and capable of differentiating myeloid cells to hepatocytes. The other objective method for producing hepatocytes is characterized by comprising culturing myeloid cells in the presence of the differentiation inducer.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-78482

(P2002-78482A)

(43) 公開日 平成14年3月19日 (2002.3.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 5/06		C 0 7 K 14/475	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/475		C 1 2 N 5/02	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/02		5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2000-268156(P2000-268156)	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22) 出願日	平成12年9月5日 (2000.9.5)	(72) 発明者	宮崎 正博 岡山県岡山市福田38番地の17
		(72) 発明者	島 伸行 栃木県河内郡南河内町緑4丁目17-28
		(72) 発明者	東尾 侃二 埼玉県川越市山田1769-10
		(74) 代理人	100090941 弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分化誘導剤

(57) 【要約】

【課題】 新規な分化誘導剤の提供。

【解決手段】 TCF-IIあるいはHGF等の肝細胞増殖因子を有効成分とする、骨髄細胞から肝実質細胞への分化誘導剤。骨髄細胞を該分化誘導剤存在下で培養することを特徴とする、肝実質細胞の生産方法。

【効果】 人工肝臓あるいは肝細胞移植などの再生医療の分野で有用。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝細胞増殖因子を有効成分とする、骨髓細胞から肝実質細胞への分化誘導剤。

【請求項2】 肝細胞増殖因子がTCF-IIである、請求項1記載の分化誘導剤。

【請求項3】 肝細胞増殖因子がHGFである、請求項1記載の分化誘導剤。

【請求項4】 骨髓細胞を請求項1～3記載の分化誘導剤存在下で培養することを特徴とする、肝実質細胞の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、肝細胞増殖因子を有効成分とする、骨髓細胞から肝実質細胞への分化誘導剤に関する。又、骨髓細胞を該分化誘導剤存在下で培養することを特徴とする、肝実質細胞の生産方法に関する。本発明は、人工肝臓あるいは肝細胞移植などの再生医療の分野で有用である。

【0002】

【従来の技術】近年、肝実質細胞（肝臓の実質細胞）を人工的に培養することによる人工肝臓の開発が活発に検討されている。これまでに提案された人工肝臓の多くは、ブタなどの異種動物から単離した細胞や、ヒト肝癌細胞などの株化した細胞が用いられてきた。しかしながら、これらの細胞で作った人工臓器を肝疾患患者に利用するときには、異種動物由来蛋白質の抗原性による免疫反応が起きたり、癌細胞由来のメタロプロテアーゼ等が生体に悪影響を及ぼすなどの問題があった。一方、ヒト肝臓から肝実質細胞を採取しそれを培養する方法も考案されたが、分化したヒト肝実質細胞は分裂回数が有限である等の問題があり、未だヒト肝実質細胞を大量に培養する技術は確立されておらず、実質的には人工肝臓よりも生体肝移植技術の方が先行している。生体肝移植は今般様々な医療機関でなされるようになってきているが、移植を受けた患者は、組織適合抗原の不一致により生ずる移植片拒絶反応を抑制するために、一生の間、強い免疫抑制剤の投与を余儀なくされている。それゆえ、原理的には拒絶反応が起きないはずである患者自身に由来する細胞の使用が望ましいとされている。そこで、無限増殖能と多分化能を共に有するいわゆる幹細胞からの肝実質細胞の生産法を確立することが待ち望まれている。

【0003】骨髓細胞は、様々な細胞へと分化する能力を有する一種の幹細胞であることが知られている。それゆえ、組織や臓器の移植あるいは人工臓器などの新規医療分野においては、骨髓細胞から様々な細胞への分化誘導、あるいは組織や臓器を再構築する試みがなされてきた。具体的には、骨髓細胞から様々な血球細胞や骨芽細胞、筋細胞、脂肪細胞、軟骨細胞等をin vitroで分化させる技術が確立されてきている。肝実質細胞についても、骨髓細胞から分化しようと考えられている。即ち、

骨髓細胞の移植試験の結果、移植した骨髓細胞に由来する肝実質細胞が存在することが報告されている（Petersen B.E. et al., Science, 284, p1168-1170 (1999)）。これより、骨髓細胞中には肝細胞の前駆細胞が存在すると考えられていた。しかしながら、その分化のメカニズムについては不明な点が多く、今日までin vitroにおいて骨髓細胞から効率よく肝細胞に分化させる方法を見出したという報告はなされていない。

【0004】TCF-II (WO90/10651号) は、ヒト由来の線維芽細胞の培養液から見出された糖タンパク質で、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量測定で、非還元下では $78,000 \pm 2,000$ 又は $74,000 \pm 2,000$ 、また還元下では $52,000 \pm 2,000$ 、 $30,000 \pm 2,000$ 、及び $26,000 \pm 2,000$ のバンドを示す。TCF-IIは抗腫瘍活性、血管内皮細胞や肝細胞の増殖促進活性など多様な生物活性を示すことが知られている。cDNA解析により、TCF-IIは肝細胞増殖因子HGF (Miyazawa K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967-973 (1989)) の内部アミノ酸配列のうち5アミノ酸配列が欠失したタンパク質であることが明らかとなっている。TCF-IIとHGFは5つのアミノ酸の違いにより、物理化学的性質、生物活性、三次元構造等に差異が認められる (Shima N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 200, p808-815 (1994))。TCF-II及びHGFは、共に肝実質細胞の増殖を強力に促進することが知られているが、これまでにTCF-IIあるいはHGFによって骨髓細胞等の幹細胞から肝実質細胞への分化に成功したという報告はなされていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上述の状況に鑑み、本発明者らは鋭意研究の結果、骨髓細胞をTCF-IIあるいはHGF等の肝細胞増殖因子とともに培養することにより、効率良く肝実質細胞が生産可能であることを見出した。従って本発明は、肝細胞増殖因子を有効成分とする、骨髓細胞から肝実質細胞への分化誘導剤、及び骨髓細胞を該分化誘導剤存在下で培養することを特徴とする、肝実質細胞の生産方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、肝細胞増殖因子を有効成分とする、骨髓細胞から肝実質細胞への分化誘導剤に関する。又、骨髓細胞を該分化誘導剤存在下で培養することを特徴とする、肝実質細胞の生産方法に関する。本発明は、人工肝臓あるいは肝細胞移植などの再生医療の分野に有用である。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明分化誘導剤の有効成分である肝細胞増殖因子としては、好ましくはTCF-IIが挙げられる。TCF-IIはヒト線維芽細胞IMR-90由来のものを用いることが可能であり、又、WO90/1

0651号公報に記載された遺伝子配列に基づいて、微生物や他の細胞により遺伝子工学的手法により生産されたものでもよい。又、WO92/01053号公報に開示された遺伝子工学的手法により得られたものを用いてもよい。この時、宿主細胞又は微生物の違いによる糖鎖の異なったものや、糖鎖の結合していないものであっても使用可能であるが、好ましくは糖鎖の結合しているものを用いる。これらの方法により得られたTCF-IIは、通常の単離精製法によってさらに濃縮、精製することができる。例えば、有機溶媒による沈殿法、塩析、ゲル濾過、モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマト、電気泳動法等が挙げられる。モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトによる精製は、特開平5-97号公報に開示されているモノクローナル抗体を用いて精製することができる。得られた精製TCF-IIは、凍結乾燥あるいは凍結保存することができる。その他、TCF-IIと同様の活性を有するものであれば、本発明と同様の薬剤として利用可能である。例えば、TCF-II蛋白質と5アミノ酸の違いを有する蛋白質である肝細胞増殖因子(HGF; 特開昭63-22526号、Miyazawa K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967-973(1989))、あるいは精製Scatter Factor(SF; Gherardi E. and Stocker M., Nature, 346, 228(1990))などが挙げられる。

【0008】本発明で用いる哺乳動物由来の骨髄細胞としては、ヒトを含むすべての哺乳動物の骨髄細胞であり、浮遊性のものを用いることができる。骨髄細胞を公知の方法により採取し、通常の細胞培養液、好ましくは10%の牛胎児血清を含むDMEM/HamF12培養液(DMEMとHamF12を等量混ぜ合わせて作製)に懸濁した後、プラスチックシャーレー上に播種し培養する。この操作により、接着性の細胞はシャーレーに接着するため、浮遊性の細胞のみが採取可能となる。このようにして得られた浮遊性細胞を含む培養液を遠心分離し、浮遊細胞のみを回収することができる。

【0009】次に、この方法により得られた浮遊性の骨髄細胞を本発明の分化誘導剤と共に培養する。このときの分化誘導剤の濃度は、1ng/ml~10μg/mlが好ましい。本発明分化誘導剤を添加して培養する時の基礎培地は、特に限定されないが、特に好ましくは10%の牛胎児血清を含むDMEM/HamF12培地を用いる。又、骨髄由来浮遊細胞を培養する時に適当なコーティング剤、好ましくはコラーゲンを塗布した培養フラスコを、細胞の接着性を高めるために用いても良い。このようにして培養した骨髄細胞は、1~3週間培養することにより、肝実質細胞へと分化する。このことは、アルブミン、α-フェトプロテイン、CK8、CK18等の肝実質細胞に特異的なマーカーが発現してくることで確認できる。確認方法としては、特異マーカーに対する免疫染色法等による蛋白質発現、特異マーカー遺伝子の発現を指標とするノーザン

ブロット法又はRT-PCR法が挙げられる。

【0010】このようにして分化誘導された骨髄細胞に由来する肝実質細胞は、人工肝臓あるいは臓器移植として利用可能である。より具体的には、分化させた肝実質細胞を、ホローファイバー等を備えたリアクター中で培養することにより、体外循環型の人工肝臓としての利用が可能である。あるいは、肝疾患患者自身の骨髄細胞に由来する肝実質細胞を脾臓に注入し、脾静脈から門脈を経由して肝臓へ移植することが可能である。さらに本発明によれば、肝移植を必要とする患者本人の肝細胞を本人の骨髄細胞より大量に得ることが可能となり、移植に伴う免疫抑制剤等の投与も必要なくなる。

【0011】

【実施例】以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【製造例1】TCF-IIの精製

WO90/10651号公報に開示された方法、及び東尾らの方法(Higashio K. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 170, 397-404 (1990))に準じて細胞を培養し、精製TCF-IIを得た。即ち、ヒト線維芽細胞IMR-90(ATCC CCL-186)を、5%仔牛血清を含むDMEM 100mlを入れたローラーボトル(500ml用、ファルマシア社)に 3×10^6 個移植し、0.5~2回転/分の回転速度で回転させながら7日間培養を続けた。総細胞数が 1×10^7 個になったところでトリプシンにより細胞を剥離し細胞をボトル底面に集め、培養液250mlと共に5~9メッシュのセラミック100g(東芝セラミック社)を殺菌して投入し、24時間静置して培養した。その後、さらに培養液を250ml加え、静置培養を継続した。7~10日ごとに培養液を全量(500ml)回収し、同量の新鮮培地を補給した。このようにして2ヵ月間生産を継続し、ローラーボトル一本当たり4Lの培養液を回収した。このようにして得た培養液当たりの比活性は32μg/mlあった。培養液750Lをメンブランフィルター(MW6000カット; アミコン社)処理によりUF濃縮し、CMセファデックスC-50(ファルマシア社)、ConAセファロース(ファルマシア社)、MonoSカラム(ファルマシア社)、ヘパリンセファロース(ファルマシア社)による4段階のクロマト精製を行い、精製TCF-IIを得た。

【0012】

【製造例2】遺伝子組換えTCF-IIの生産

WO92/01053号公報に開示された方法に従い、TCF-II遺伝子を組み込んだ細胞を培養し、精製TCF-IIを得た。形質転換ナマルワ(Namalwa)細胞を培養し、培養液20Lを得た。この培養液をCMセファデックスC-50クロマト(ファルマシア社)、ConAセファロースCL-6Bクロマト(ファルマシア社)、MonoSカラム(ファルマシア社)を装着した

HPLCの順に処理を行い、約11mgの精製TCF-IIを得た。

【0013】

【実施例1】TCF-IIによる骨髄細胞の肝細胞への分化誘導（免疫染色による確認）

2ヶ月令のウィスター系ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取し、10%の牛胎児血清（ギブコ社）を含むDMEM/Ham F12培養液（DMEM（ギブコ社）とHamF12（ギブコ社）を等量混ぜ合わせて作製；以下、骨髄細胞用培地と表記）に懸濁し、プラスチックのシャーレー（ファルコン社）に播種した。細胞を5%炭酸ガス含有空気相下、37℃で60分培養した後、培養液を回収した。得られた培養液を1000rpm、5分間遠心分離し、上清を除去した。10mlの骨髄細胞用培地を加え再度遠心分離した。上清を除去した後、骨髄細胞用培地に製造例2で得られたTCF-IIを最終濃度が1 µg/mlになるように加えた培地（以下、TCF-II培地と表記）を加え、細胞を懸濁させた。35 mmディッシュ（コーニング社）の上にミカロボラスらの方法（Michalopoulos G. et al., Exp. Cell Res., 94, p70-78, (1975)）に従い0.3%ラットタイプ1コラーゲンを塗布したカバースリップ（24×24mm、マツナミ社）を入れ、 1×10^4 個/cm²の密度で細胞をまき込み、5%炭酸ガス含有空気相下、37℃で3週間培養した。尚、培養期間中は3日毎に新鮮なTCF-II培地に交換した。

【0014】培養終了後、4%のパラフォルムアルデヒドを含むPBSで室温にて30分処理し細胞を固定した。固定した細胞を1%ウシアリブミン、0.1%Triton X 100、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS（以下、ブロッキング溶液と表記）で4℃にて30分間処理した。この後、以下の各種一次抗体液を加え、4℃にて一晩反応させた。即ち、抗ラットアルブミン抗体（ダコ社）、抗ラットα-フェトプロテイン（フナコシ社）、抗ラットCK8（フナコシ社）、及びCK18（フナコシ社）をそれぞれブロッキング溶液にて100倍希釈したものを用いた。一次抗体反応後、PBSにて細胞を洗浄した。ブロッキング溶液にて100倍希釈したTRITC標識抗ラットIgG家兎抗体（サンタクルーズ社）溶液を細胞に加え4℃で3時間反応させた後PBSにて洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察した。この結果、TCF-IIを加えて3週間培養した骨髄細胞は、肝実質細胞のマーカであるアルブミン、α-フェトプロテイン、CK8、CK18のいずれも陽性の細胞に変化していることが免疫染色の結果確認され、肝細胞に分化していた。一方、TCF-IIを加えずに培養した骨髄細胞には、免疫染色の結果肝実質細胞のマーカは発現していなかった。以上の操作によって、大量の肝細胞を取得することができた。従って、骨髄細胞をTCF-II存在下で培養することにより、TCF-IIは骨髄細胞を肝実質細胞へ分化誘導することが明らかとなった。

【0015】

【実施例2】TCF-IIによる骨髄細胞の肝細胞への分

化誘導（マーカー遺伝子発現による確認）

2ヶ月令のウィスター系ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取し、実施例1と同様に骨髄細胞用培地に懸濁し、プラスチックのシャーレー（ファルコン社）に播種した。細胞を5%炭酸ガス含有空気相下、37℃で60分培養した後、培養液を回収した。得られた培養液を1000rpm、5分間遠心分離し、上清を除去した。10mlの骨髄細胞用培地を加え再度遠心分離した。上清を除去した後、骨髄細胞用培地あるいは製造例2のTCF-II培地を加え、細胞を浮遊させた。60mmディッシュ（コーニング社）にそれぞれ 1×10^4 個/cm²の密度で細胞をまき込み、5%炭酸ガス含有空気相下、37℃で培養した。3日間培養後、新鮮な骨髄細胞用培地あるいはTCF-II培地に交換し、さらに2日間培養した。培養後、いずれの細胞も新鮮な骨髄細胞用培地に交換した後、16日間培養を継続した。又、その間3日毎に新鮮な骨髄細胞用培地に培地交換を行った。

【0016】培養終了後、細胞をアイソジェン（和光純薬社）で処理し、添付のプロトコルに従い、全RNAを抽出した。1 µgの全RNAを鋳型として、スーパースクリプトII（クオンテック社）を用いて、そのプロトコルに従いcDNAを合成した。アルブミン、α-フェトプロテイン、及びTCF-IIの受容体であるc-Metそれぞれの遺伝子の発現の有無を、得られたcDNAを鋳型として、PCRにより以下のごとく検討した。即ち、436-bpからなるアルブミン遺伝子断片増幅のために、Fプライマー（配列表配列番号1）及びRプライマー（配列表配列番号2）を用いた。水11.8 µl、10×Ampli-Taqバッファー（タカラ社）2.0 µl、2.5 mM dNTP 2 µl、20 µMアルブミンFプライマー 1.0 µl、20 µMアルブミンRプライマー 1.0 µl、Ampli-Taq Gold（タカラ社）0.2 µl、水で10倍希釈したcDNA溶液2 µlをPCR用の0.5 mlチューブ（タカラ社）に加え混合した後、PCR反応（94℃で4分処理後、94℃で30秒、62℃で90秒、72℃で1分の処理を30回繰り返した後、72℃で4分処理）を行った。次に、686-bpからなるα-フェトプロテイン遺伝子断片増幅のために、Fプライマー（配列表配列番号3）及びRプライマー（配列表配列番号4）を用いた。水11.8 µl、10×Ampli-Taqバッファー（タカラ社）2.0 µl、2.5 mM dNTP 2 µl、20 µM α-フェトプロテインFプライマー 1.0 µl、20 µM α-フェトプロテインRプライマー 1.0 µl、Ampli-Taq Gold（タカラ社）0.2 µl、水で10倍希釈したcDNA溶液2 µlをPCR用の0.5 mlチューブ（タカラ社）に加え混合した後、PCR反応（94℃で4分処理後、94℃で30秒、55℃で45秒、72℃で1分の処理を30回繰り返した後、72℃で4分処理）を行った。さらにα-フェトプロテイン遺伝子断片増幅のために、PCR反応産物を希釈して、増幅断片の内側のプライマーを用いて再度PCR反応を以下のごとく行った。即ち、2回目の622-bpからなるα-フェトプロテイン遺伝子断片

増幅のために、Fプライマー（配列表配列番号5）及びRプライマー（配列表配列番号6）を用いた。水11.8 μ l、10 \times Ampli-Taqバッファー（タカラ社）2.0 μ l、2.5 mM dNTP 2 μ l、20 μ M α -フェトプロテイン2回目用Fプライマー 1.0 μ l、20 μ M α -フェトプロテイン2回目用Rプライマー 1.0 μ l、Ampli-Taq Gold（タカラ社）0.2 μ l、水で10倍希釈した1回目のPCR反応産物2 μ lをPCR用の0.5mlチューブ（タカラ社）に加え混合した後、PCR反応（94 $^{\circ}$ Cで4分処理後、94 $^{\circ}$ Cで30秒、60 $^{\circ}$ Cで45秒、72 $^{\circ}$ Cで1分の処理を30回繰り返した後、72 $^{\circ}$ Cで4分処理）を行った。次に、725-bpからなるc-Met遺伝子断片増幅のために、Fプライマー（配列表配列番号7）及びRプライマー（配列表配列番号8）を用いた。水11.8 μ l、10 \times Ampli-Taqバッファー（タカラ社）2.0 μ l、2.5 mM dNTP 2 μ l、20 μ M Fプライマー 1.0 μ l、20 μ M Rプライマー 1.0 μ l、Ampli-Taq Gold（タカラ社）0.2 μ l、水で10倍希釈したcDNA溶液2 μ lをPCR用の0.5mlチューブ（タカラ社）に加え混合した後、PCR反応（94 $^{\circ}$ Cで4分処理後、94 $^{\circ}$ Cで30秒、58 $^{\circ}$ Cで1分、72 $^{\circ}$ Cで1分の処理を30回繰り返した後、72 $^{\circ}$ Cで4分処理）を行った。

【0017】次に、それぞれのPCRでの反応産物の一部を、常法に従い1 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルで展開し、増幅断片の有無を検討

した。さらに、得られた増幅断片がそれぞれの遺伝子であることを確認することを目的として、タックダイターミネーターサイクルシーケンスキット（パーキンエルマー社）を用いて、添付のプロトコールに従い塩基配列を決定した。この結果、TCF-II培地で5日間培養した後、骨髓細胞用培地で16日間培養した骨髓細胞は肝実質細胞のマーカーであるアルブミン、 α -フェトプロテインの遺伝子が発現していることが確認された。又、TCF-II受容体であるc-Metの遺伝子の発現も確認され、TCF-IIに反応性を示す細胞であることが明らかとなった。一方、TCF-IIを含まない骨髓細胞用培地のみで培養した骨髓細胞は、アルブミン、 α -フェトプロテイン、c-Metいずれの遺伝子の発現も認められなかった。従って、骨髓細胞をTCF-II存在下で培養することにより、TCF-IIは骨髓細胞を肝実質細胞へ分化誘導することができた。

【0018】

【発明の効果】本発明により、肝細胞増殖因子を有効成分とする、骨髓細胞から肝実質細胞への分化誘導剤、及び哺乳動物の骨髓から取得した骨髓細胞より浮遊細胞のみを分取し、それらを該分化誘導剤存在下で培養することを特徴とする、肝実質細胞の生産方法が提供される。本発明は、人工肝臓あるいは肝細胞移植などの再生医療の分野で有用である。

SEQUENCE LISTING

<110>; SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.
 <120>; Agent for cell differentiation
 <130>; YTP00005
 <160>; 8
 <170>; PatentIn Ver. 2.1
 <210>; 1
 <211>; 20
 <212>; DNA
 <213>; Artificial Sequence

<220>;
 <223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA
 <400>; 1
 atacaccag aaagcacctc

20

<210>; 2
 <211>; 21
 <212>; DNA
 <213>; Artificial Sequence
 <220>;
 <223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA
 <400>; 2
 caggaattgt gcaatgtca c

21

<;210>; 3
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA
<;400>; 3
aacagcagag tgctgcaaac 20
<;210>; 4
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA
<;400>; 4
aggtttcgtc cctcagaaag 20

<;210>; 5
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA
<;400>; 5
caccatcgag ctgcctatt 20

<;210>; 6
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA
<;400>; 6
tgatgcagag cctcctgttg 20

<;210>; 7
<;211>; 23
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA
<;400>; 7
cagtgatgat ctcaatgggc aat 23

<;210>; 8

<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA

<;400>; 8
aatgccctct tcctatgact tc

22

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA92X BA24 BB23
CA44
4H045 AA10 AA30 CA40 DA01 EA28
FA74